

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 241—249, Mai 1969

## Untersuchungen zur amyloklastischen $\alpha$ -Amylase-Bestimmung<sup>1)</sup>

### *The determination of $\alpha$ -amylase*

Von K. LORENTZ, A. ZANDER<sup>2)</sup> und J. ADLUNG

*Aus der I. Medizinischen Klinik der Medizinischen Akademie Lübeck (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter)*

(Eingegangen am 10. Dezember 1968)

### I. Optisches Verhalten von Jod-Stärke-Komplexen

Die Intensität der Jod-Stärke-Reaktion ist bei konstanter Jodkonzentration von dem  $\overline{DP}$  der verwendeten Stärke, dem pH, der Temperatur, der Gegenwart organischer Verbindungen und der Reihenfolge ihrer Zugabe bei Bildung des Jod-Stärke-Komplexes abhängig. 1—4 mg Amylum solubile zeigen bei Zusatz von 5  $\mu$ Val Jod, 22  $\mu$ Val Jodid und 19 mVal Essigsäure eine lineare Extinktionszunahme. Bei 578 nm, 1 cm Schichtlänge, 20 ml Volumen, pH 2,5 und 25° beträgt der Extinktionskoeffizient pro mg Amylum solubile 0,440. Er nimmt um 0,008 pro Grad Temperaturanstieg ab.

### *The optical properties of iodine-starch complexes*

The intensity of starch-iodine color at constant iodine concentration depends on pH, temperature,  $\overline{DP}$  of the starch batch, presence of organic compounds, and the sequence of their addition in the development of the starch-iodine complex. In the range, 1—4 mg soluble starch, the addition of 5  $\mu$ Val iodine, 22  $\mu$ Val iodide, and 19 mVal acetic acid, shows a linear increasing extinction. The coefficient of extinction is 0.440 per mg soluble starch at 578 nm, d = 1 cm, vol. = 20 ml, pH 2.5, T = 25° and decreases about 0.008 per degree Celsius.

Einfache Durchführung und kurze Meßdauer haben die bevorzugte Anwendung amyloklastischer Bestimmungen im klinischen Laboratorium begründet, obwohl ihre Ergebnisse, im Unterschied zu saccharogenen Methoden, nicht allein von der Wirkung des Enzyms, sondern außerdem von den physikochemischen Eigenschaften der Meßgröße bestimmt werden. Es waren daher zunächst die optischen Eigenschaften der Jod-Stärke- und Jod-Dextrin-Komplexe und deren Abhängigkeit von den Parametern Temperatur, pH, Proteinzusatz, Jod- und Stärkekonzentration zu untersuchen.

### Theoretische Grundlagen

Jod wird beim Zusatz zu Amyloselösungen unter Bildung eines blauen Komplexes teilweise durch das Polysaccharid gebunden, während ein kleiner Teil frei in Lösung bleibt. Dieses Gleichgewicht, die Bindungskapazität des Amylosemoleküls und die Stabilität der in ihren Windungen angeordneten Polyjodkette sind nach Untersuchungen von SZEJTLI und Mitarbeitern (1, 2) an die durchschnittliche Länge der helicalen Amylose-segmente gebunden. Sie hängen damit von pH, Temperatur, Jodidkonzentration, anderen Komplexbildnern und dem mittleren Polymerisationsgrad ( $\overline{DP}$  = average degree of polymerization) ab. Die Jodbindungskapazität der Amylose nimmt mit fallendem  $\overline{DP}$  unter Wanderung des Absorptionsspektrums ab, die Jodfarbe erlischt, sobald die Kettenlänge 45 Glucoseeinheiten unterschreitet (3).

Da bei der Präparation von Amylose nicht immer gleiche Fraktionen erhalten werden und die im Handel befindlichen Chargen große Unterschiede ihrer Jodbindungsfähigkeit aufweisen, ergeben Aktivitätsbestimmungen von  $\alpha$ -Amylase mit derselben Serumprobe bei verschiedenen Amylosen Unterschiede von 1:2, während lösliche Stärke unterschiedlicher Herkunft maximale Differenzen von 1:1,2 liefert (4). Da verzweigte Substrate (Stärke) besser als lineare (Amylose) abgebaut werden (5), wurde Amylum solubile, das wegen seiner guten Löslichkeit zudem eine Substratsättigung des Enzyms gewährleistet, der Amylose vorgezogen.

### Methodik

#### Reagenzien

Alle Reagenzien waren von p. a. Reinheit und wurden mit demineralisiertem Wasser gelöst.

#### Substrat

0,8proz. Stärkelösung (Amylose 0,4proz.).

1,6 g Amylum solubile (Merck Nr. 1252) in etwa 30 ml Äthanol suspendieren und in 150 ml siedendes Wasser gießen (keine offene Flamme!), Rest ebenfalls mit Äthanol nachspülen. Unter Umrühren und weiterem Kochen bis zu völliger Durchsichtigkeit lösen. Abkühlen lassen und auf 200 ml auffüllen. Bei Vermeidung mikrobieller Infektion 1 Woche bei Raumtemperatur haltbar. Amylum solubile nach Zulkowsky (Merck Nr. 1257) und Amylose (British Drug Houses Ltd.) in gleicher Weise lösen.

#### Jod-Reagenz

Jod 0,00026N, Kaliumjodid 0,0011N, Essigsäure 1N, 2,6 ml 0,1N Jodlösung (Merck Nr. 9099) mit 60 ml Eisessig mischen und mit Wasser auf 1 l auffüllen. In dunkler Flasche 1 Woche haltbar. Kontrolle durch Titration mit Natriumthiosulfat.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2)</sup> Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inaugural-Dissertation von A. ZANDER.

Poolserum von 20 gesunden Probanden (6,9 g/100 ml Eiweiß)  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas (Merck Nr. 1326), Humanalbumin „reinst“ (Behringwerke).

#### Vorgehen

Bei allen Versuchen wurde, wenn nicht anders vermerkt, das Jod-Reagenz zuletzt zum Ansatz gegeben. Nach sorgfältiger Mischung (Umwenden des Röhrchens) von 1 ml Stärkelösung (verschiedener Verdünnung) und 19 ml Jod-Reagenz wurde bei Temperaturkonstanz in der 1 cm Durchlaufküvette gegen Luft im Photometer Eppendorf bei 578 nm oder im Spektralphotometer PMQ II Zeiss bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Zur Registrierung von Streulicht- und Trübungseffekten diente die entsprechende Ausrüstung zum Photometer Eppendorf.

#### Ergebnisse

##### Jod-Stärke-Komplex

Amylum solubile und Zulkowsky-Stärke zeigen oberhalb 450 nm dasselbe Absorptionsspektrum wie Amylose (Abb. 1). Das im kurzwelligen Bereich auftretende

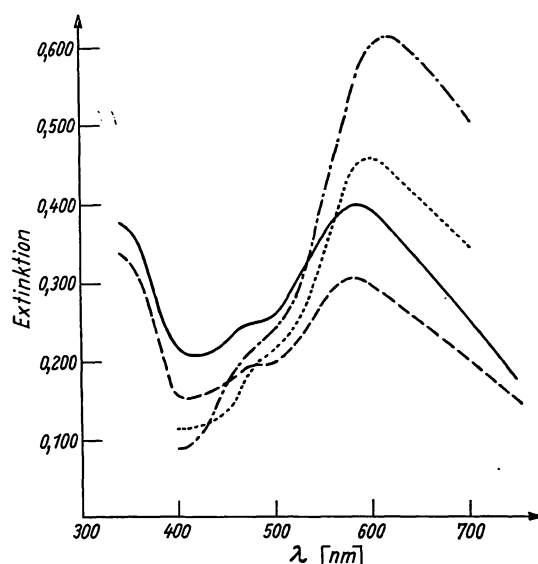


Abb. 1

Absorptionsspektren von Jod-Stärke- und Jod-Amylose-Komplexen. Vol. 20,0 ml, d = 1 cm, Messung bei 25° im Spektralphotometer Zeiss gegen Luft. 0,8 mg Amylum solubile mit 4 µVal Jod —, dasselbe mit Zusatz von 5 µl Serum und 30 Min. Inkubation ----, gleiche Jodmenge mit 5 mg Zulkowsky-Stärke ..... und 0,3 mg Amylose - · - · - ·.

Maximum läßt sich, nach Vergleich mit Befunden von SEN GUPTA und Mitarbeitern (6), dem Amylopektin zuordnen.

Beim Abbau durch  $\alpha$ -Amylase entstehen Amylo- und Erythrodextrine, deren Jodkomplexe ein Absorptionsmaximum um 500 nm aufweisen. Ähnliche, von der zugesetzten Menge abhängige, spektrale Verschiebungen verursachen nach unseren Beobachtungen auch Tween und Laurylsulfat. Schließlich führt auch eine relative Zunahme der Jodkonzentration allein zu Verschiebung des Maximums in den kurzwelligen Bereich und schließlich zum Auftreten von freiem Jod, dessen Absorptionsmaximum bei 360 nm liegt (Abb. 2). Diese Veränderungen resultieren bei Einwirkung hoher Amylaseaktivitäten (7, 8). HUGGINS und RUSSEL (9) schlugen daher die Messung bei 660 nm vor, wodurch die Empfindlichkeit jedoch vermindert wird.

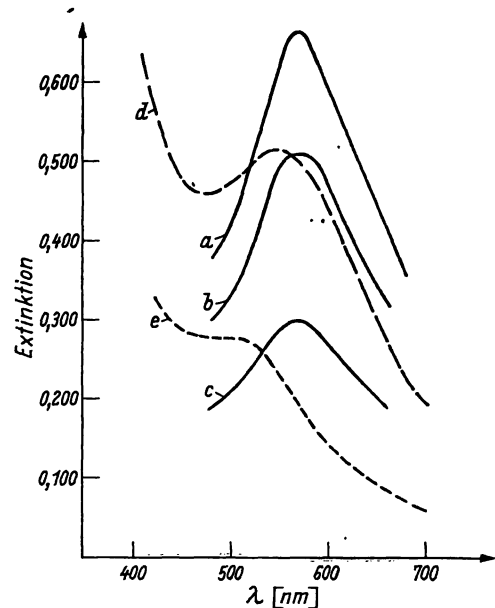


Abb. 2

Absorptionsspektren von Jod-Stärke-Komplexen verschiedener Zusammensetzung. Vol. 20,0 ml, d = 1 cm. Zulkowsky-Stärke: a = 20 mg, b = 10 mg und c = 4 mg mit 120 µVal Jod; d = 4 mg mit 120 µVal Jod und e = 10 mg nach Abbau durch Serumamylase mit 120 µVal Jod. Messung bei 25° im Spektralphotometer Zeiss (s. o.)

Von allen geprüften Substraten war lösliche Stärke für die Amylase-Bestimmung am besten geeignet, da sie folgende zwei Voraussetzungen erfüllte:

1. Auf Grund ihrer guten Löslichkeit kann eine so hohe Stärkekonzentration gewählt werden, daß die enzymatische Bildung von Amylo- und Erythrodextrinen das Spektrum und das Verteilungsgleichgewicht der Jodmoleküle nicht beeinflusst (Konstanz der Meßgröße).

2. Der noch hohe Polymerisationsgrad (DP) erlaubt die genaue Messung geringer Stärkemengen (Empfindlichkeit). Das LAMBERT-BEERSsche Gesetz gilt für einen ausreichenden Meßbereich (Linearität).

Dieser Bereich liegt bei Einsatz von 5 µVal Jod zwischen 0,4 und 4 mg Amylum solubile (Abb. 3). 1 mg Stärke entspricht bei 578 nm und d = 1 cm einem  $\Delta_E$  von 0,440. Die Stärkemenge läßt sich bei gegebener Extinktion nach  $\Delta_E \times 2,3 \approx$  mg Stärke berechnen. Da die nach Einwirkung von  $\alpha$ -Amylase verbliebene Stärkemenge der Enzymaktivität umgekehrt proportional sein muß, wurde die bei 5 µVal Jod maximal mögliche Menge von 4 mg Amylum solubile für alle Bestimmungen gewählt.

Setzt man steigende Jodmengen zu 4 mg Amylum solubile hinzu, dann tritt, als exponentielle Funktion, bis zu 5 µVal Jod Farbvertiefung ein. Die maximale Bindungskapazität von 1 mg Stärke betrug damit 1,25 µVal Jod. Die halbmaximale Kapazität wurde mit 0,25 µVal Jod graphisch ermittelt.

##### pH, Stabilität, Temperatur

Die Intensität der Jod-Stärke-Farbe ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig (8). Ihr Maximum lag bei pH 4,0 (Tab. 1), doch wählten wir die Messung in

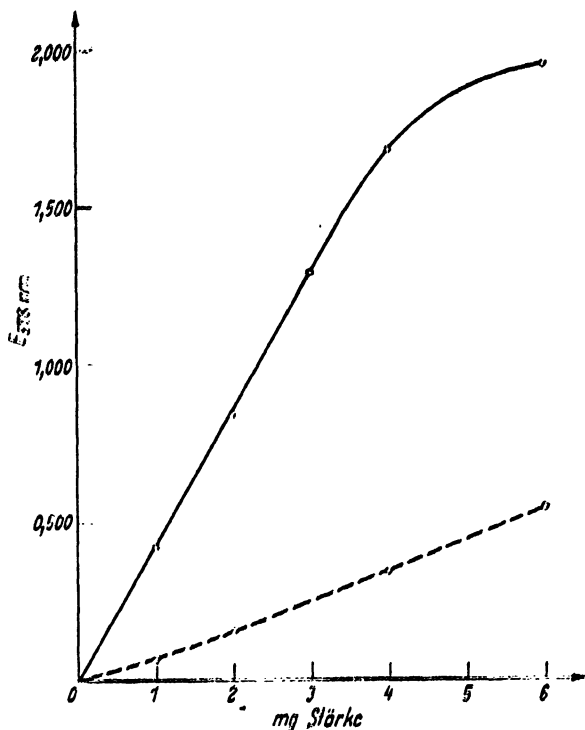


Abb. 3

Extinktion verschiedener Mengen Stärke bei Zusatz von 5  $\mu$ Val Jod  
 ----- Amylum solubile, ---- Zulkowskystärke. Vol. 20,0 ml,  
 d = 1 cm,  $\lambda$  = 578 nm,  $T$  = 25°

1N Essigsäure (pH 2,5), da nur bei diesem niedrigen pH ein sofortiger Stop der  $\alpha$ -Amylasewirkung eintrat. Die Extinktion war bei diesem Vorgehen 60 Min. konstant, während bei einer Kaliumjodidkonzentration von 0,285 mN (gleich 0,12N in der Jodlösung) die Intensität nach 40 Min. abnahm.

Tab. 1

Extinktion von 3 mg Amylum solubile und 5  $\mu$ Val Jod bei verschiedenen pH  
 Standardansatz (Vol. 20 ml, d = 1 cm,  $T$  = 25°)

pH	$E_{578}$
1,0	0,835
2,5	1,312
4,0	1,525
6,0	1,475
7,0	1,400
9,5	0,530
11,5	farblos

Nach SOMOGYI (10) ist ein erheblicher Überschuss an Kaliumjodid nötig, um den Verbrauch von Jod durch organische Verbindungen im Serum zu verhindern. Nach unseren Beobachtungen trat der Extinktionsabfall auch in reinen Jod-Stärke-Lösungen auf. Nach Angaben von KERN (11) und RICHTERICH (12) wird die Jod-Stärke-Reaktion mit fallender Temperatur intensiver. Amylose und Amylum solubile zeigten im Experiment bei steigender Temperatur eine zwischen 18° und 41° linear abfallende Extinktion. Der Neigungswinkel der Geraden hing von der absoluten Stärkemenge ab und wies bei 578 nm im Ansatz mit 3 mg Stärke ein

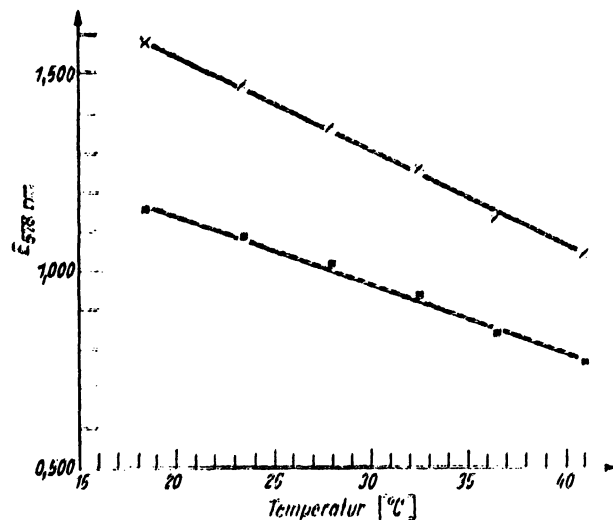


Abb. 4

Einfluß der Temperatur auf die Extinktion einer Lösung von 3 mg Amylum solubile mit 5  $\mu$ Val Jod. Vol. 20,0 ml, d = 1 cm,  $\lambda$  = 578 nm, Messung im thermokonstanten Küvettenhalter  
 x = ohne    ■ = mit Serum

$\Delta E$  von 0,024 pro Grad auf (Abb. 4). Die Erwärmung der Probe durch die Strahlung im Lichtweg des Photometers war zu vernachlässigen.

### Protein

Zusatz von Serum führt zu einer Verminderung der Jod-Stärke-Reaktion (13, 14, 15). Es handelt sich dabei, wie Denaturierungsversuche von SEARCY und Mitarbeitern (13) ergaben, um einen, von der Einwirkungszeit unabhängigen, quantitativen chemischen Effekt, der sofort nach Zusatz von Serum eintritt.

Folgende Beobachtungen sprachen dabei für eine Wirkung von Protein:

1. Eiweißfreie Serumultrafiltrate und eiweißfreie Überstände nach Fällung des Serums mit Perchlor-, Wolfram- bzw. Trichlor-essigsäure änderten die Jod-Stärke-Farbe nicht.
2. Salze (mit Ausnahme reduzierender Verbindungen: Kaliumcyanid, Sulfid, Dithionit, Thiosulfat,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  u. a.), Harnsäure, Kreatinin (bis zum Zehnfachen der normalen Serumkonzentration) und eiweißfreier Urin hatten keinen Einfluß auf die Farbintensität.
3. Humanalbumin führte ebenso wie Serum zu einem von der zugesetzten Menge abhängigen Extinktionsabfall.

Die dabei erhaltenen Kurven zeigten übereinstimmend eine initiale Extinktionszunahme gegenüber dem Leerwert infolge Trübung durch Proteindenaturierung und im weiteren einen Verlauf, der keiner Funktion nullter oder erster Ordnung angehörte (Abb. 5).

Protein veränderte die optischen Eigenschaften des Jod-Stärke-Komplexes nur quantitativ. Spektralkurve, pH- und Temperaturabhängigkeit zeigten den gleichen Verlauf wie bei reinen Jod-Stärke-Gemischen. Es trat lediglich eine Änderung der absoluten Extinktion ein, die von der Reihenfolge abhing, mit der die einzelnen Reagenzien dem Ansatz zugesetzt wurden. Diese muß daher zur Bestimmung der Amylaseaktivität bei Probe und Leerwert in gleicher Weise eingehalten werden. Methoden, bei denen im Leerversuch Serum erst nach

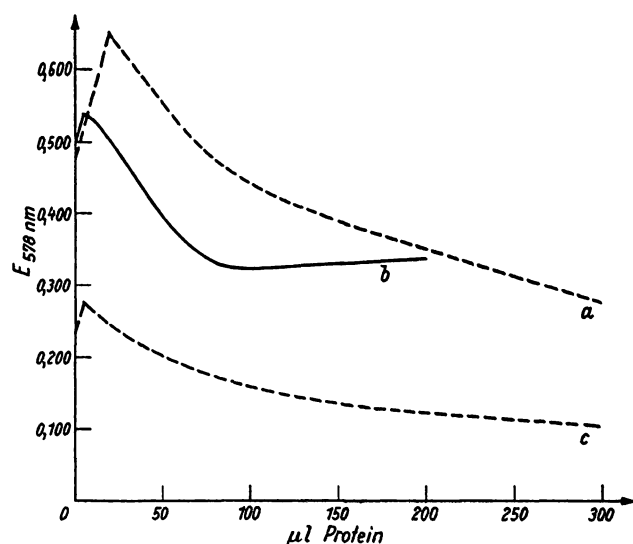


Abb. 5

Abnahme der Jod-Stärke-Reaktion durch Zusatz steigender Mengen Eiweiß nach abgeschlossener Farbentwicklung in 1N Essigsäure a = Serum (5 mg Zulkowsky-Stärke und 5  $\mu$ Val Jod) b = Serum, c = Humanalbumin 5proz. (beide mit 1,2 mg Amylose und 0,5  $\mu$ Val Jod) Vol. 20,0 ml, d = 1 cm,  $\lambda$  = 578 nm, T = 37°

Tab. 2

Optisches Verhalten von Jod-Stärke-Protein-Komplexen bei wechselnder Reihenfolge der Reagenzienzugabe. — Amylum solubile 4 mg, Jod 5  $\mu$ Val, Essigsäure 19 mMol, Serum 20  $\mu$ l; Vol. 20,0 ml, d = 1 cm, T = 25°. — Mittelwerte aus 5 Bestimmungen (Streuung  $\pm$  3% =  $\Delta E$  0,027)

Ansätze	$E_{578}$	„Trübung“ $E_{435}$	% Streulicht $T_{435}$
(I) Stärke + Serum + Jod in Essigsäure	1,780	0,850	1,9
(II) Jod in Essigsäure + Stärke	1,512	0,680	2,05
(III) Jod in Essigsäure + Stärke + Serum	1,795	0,900	3,0
(IV) Jod in Essigsäure + Serum + Stärke	1,810	0,945	3,5
(V) Jod + Serum + Essigsäure + Stärke	1,615	0,825	4,8

Jod (zur Hemmung des enzymatischen Stärkeabbaus) zugesetzt wird (7, 12, 16), liefern zu hohe Werte (Tab. 2).

Desgleichen trat beim Stehen des mit Jodreagenz unterbrochenen proteinhaltigen Ansatzes ein Extinktionsabfall durch Sedimentation ein, der durch Umwenden des Röhrchens wieder verschwand.

Das gleichsinnige Verhalten von Extinktions- und Trübungsmessung ließ eine mit bloßem Auge unsichtbare Trübung als Ursache der Extinktionsdifferenzen annehmen. Dagegen deutete der durch Tyndall-Effekt erzeugte Streulichtanteil bei Serumzugabe nach Essigsäure auf eine kolloidale Dispersion von Protein infolge Säuredenaturierung (III—V). Bei üblicher Technik (I) wurde Serum hingegen an Stärke absorbiert. Umgekehrt verminderte eine Jod-Eiweiß-Reaktion vor Zugabe von Stärke (IV u. V) die Intensität der Jod-Stärke-Farbe (13).

### Diskussion

Für amyloklastische Bestimmungen der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität ist eine einheitliche Kettenlänge (konstanter DP) des Substrats absolute Voraussetzung. Sie war bei

verschiedenen Chargen von Zulkowsky-Stärke und Amylum solubile gegeben und durch Ausmessen des Spektrums zu kontrollieren. Da zwischen Stärkemenge und Extinktion nur oberhalb von 1,25  $\mu$ Val Jod pro mg Stärke lineare Beziehungen bestehen, nutzen Verfahren, die höhere Jodkonzentrationen einsetzen, nur einen Teil dieses linearen Bereichs (Tab. 3).

Tab. 3

Verhältnis von Jod zu Stärke (\* Maisstärke, \*\* Amylose) bei verschiedenen Verfahren zur  $\alpha$ -Amylasebestimmung

	mg Stärke	$\mu$ Val Jod pro Ansatz	$\mu$ l Serum	$\mu$ Val Jod/mg Stärke
SOMOGYI (10) *	0,3	1,0	100	3,33
REIF und NADSETH (8) *	0,3	3,3	100	10,12
HUGGINS und RUSSEL (9)	4,0	40,0	50	10,0
SMITH und ROE (7)	10,0	23,6	166	2,36
ZINKER und REITHEL (18)	1,2	30,0	500	25,0
VAN LOON und Mitarbeiter (19)	4,0	40,0	100	10,0
RICHTERICH und COLOMBO (12)	0,5	0,71	20	1,42
FRIED und HOEFLMAYR (16)	0,5	2,8	20	5,68
STREET und CLOSE (17) **	0,2	4,0	10	20,0
Dieses Verfahren	4,0	5,0	20	1,25

Dies ist für die Techniken mit visueller Endpunktbestimmung (8, 10) ohne Belang, führt jedoch bei allen photometrischen Methoden zur Beschränkung auf einen kleinen linearen Meßbereich oberhalb des kritischen Punktes, wodurch eine Verkürzung der Inkubationszeit oder Verdünnung der Probe nötig werden. Das Verhältnis von Jod zu Jodid ist mit 1:7,5 mVal bei allen Methoden fast konstant.

Mit dieser Bedingung sind zwangsläufig hohe Extinktionen des Leerwerts verbunden, deren Messung entweder bei 0,5 cm Küvettenlänge oder mit einem leistungsfähigen Filterphotometer erfolgen muß. Anderenfalls kann mit 1N Essigsäure auf ein größeres Volumen verdünnt werden.

Eiweiß kann mit der Jod-Stärke-Reaktion durch Bindung an Jod (14, 20, 21), Adsorption an Stärke (15, 22) oder kolloidale Ausflockung photometrisch verschieden interferieren, wenn die Reaktionspartner in verschiedener Reihenfolge zugesetzt werden. Dabei können diese Faktoren bei kontinuierlich steigender Serum- oder Albuminzugabe einander so überlagern, daß bei kleinsten Mengen ein Extinktionsanstieg gegenüber dem proteinfreien Leerwert registriert wird, während höhere Konzentrationen die Intensität der Jod-Stärke-Reaktion durch Jodverbrauch mindern. Haupt- und Leerwert müssen deshalb auch in der Reihenfolge der Reagenzienzugabe völlig gleich behandelt werden. Proteinreiche Proben (Serum, Organhomogenate) sind unmittelbar vor der photometrischen Messung durch Umwenden des Röhrchens wieder zu mischen.

Die durch einige organische Verbindungen hervorgerufenen Veränderungen der Jod-Stärke-Farbe (Tween, Laurylsulfat; Sorbinsäure (22), Reduktionsmittel) lassen den Zusatz irgendwelcher Stabilisatoren zur Stärkelösung als unzweckmäßig erscheinen.

## II. Verhalten menschlicher Serumamylase

Serumamylase besitzt folgende Eigenschaften: pH-Optimum bei pH 7,5;  $K_m$ : Stärke 0,55–0,60 mg/ml, Amylose 8,0 mg/ml, Chlorid 4–10 mM. Andere Anionen stimulieren in der Reihenfolge: Bromid, Nitrat, Jodid, Fluorid. Jod hemmt stärker als Thiolreagenzien und Formaldehyd, unter den Komplexbildnern zeigt EDTA die stärkste Wirkung infolge Bindung von  $Ca^{++}$ , während die hohe Serumproteinkonzentration gegen Schwermetallionen schützt. Die Aktivierungsenergie wurde mit 8760 cal/mol ( $Q_{10} = 1,58$ ) gemessen.

### *The properties of human serum amylase*

The amylase activity of human serum has the following properties: optimal activity at pH 7.5;  $K_m$  starch: 0.55–0.60 mg/ml, amylose 8.0 mg/ml, chloride 4–10 mM. The stimulation by other anions is less in the order: bromide > nitrate > iodide > fluoride. Alkylating thiol reagents and formaldehyde are effective inhibitors; free iodine exerts the strongest inhibition of all, whereas EDTA is the most effective of the  $Ca^{++}$  chelating agents. The activation energy was calculated to 8760 cal per mole ( $Q_{10} = 1.58$ ).

Um eine im klinischen Labor brauchbare amyloklastische Bestimmung den im vorangehenden Abschnitt dargestellten Bedingungen anzupassen, wurden die Eigenschaften der menschlichen Serum-Amylase untersucht.

### Methodik

#### Reagenzien

Stärkelösung, Jodreagenz und Enzymlösungen siehe I. Abschnitt.

#### Pufferlösung (Tris 0,05M, pH 7,5; NaCl 0,10M):

6,06 g Tris und 5,6 g Natriumchlorid in 150–200 ml Wasser lösen, mit Salzsäure auf pH 7,5 einstellen und auf 1 l auffüllen. Die Lösung enthält 0,14M Chlorid und ist im Eissschrank 3 Monate haltbar.

#### Substratpufferlösung (Amylum solubile 0,4%; Tris 0,025M, pH 7,5; Chlorid 0,07M):

Gleiche Teile Trispuffer und Stärkelösung mischen.

#### Vorgehen

In stets gleicher Reihenfolge wurden 1,0 ml Stärke-Substratlösung zu Serum (Enzymlösung) gegeben und anschließend inkubiert, während die Leerwerte das Serum (Enzymlösung) erst nach der Inkubation erhielten. Die anschließende Zugabe von 19 ml Jodreagenz pro ml Stärkesubstratlösung unterbrach die enzymatische Hydrolyse in beiden Ansätzen. Nach sorgfältigem Umwenden der Röhrchen wurde wie in der ersten Mitteilung photometriert.

Bei der Bestimmung von Substrat-, Aktivator- und pH-Abhängigkeit des Enzyms blieben die jeweils übrigen Parameter des Ansatzes konstant. Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich alle Versuche auf den Standardansatz (pH 7,5; Tris 0,025M; NaCl 0,07M; Stärke 0,4%) 30 Min. Inkubation bei 37°, die Konzentrationsangaben auf das Reaktionsvolumen und das  $\Delta E$  auf das Endvolumen von 20 ml, gemessen bei 578 nm und 1 cm Schichtdicke.

Zur Ermittlung der Substratabhängigkeit wurde durch Entnahme entsprechender Aliquots aus dem inkubierten Ansatz nie weniger als 0,8 oder mehr als 3,0 mg Stärke gegen 5  $\mu$ Val Jod zur amyloklastischen Messung eingesetzt. Das tatsächliche  $\Delta E$  wurde durch Multiplikation (unter 0,8 mg/ml durch Division) der gemessenen Extinktion, dem Aliquot entsprechend, ermittelt.

Die Prüfung der halogenabhängigen Hemmung fand bei pH 7,5 in 0,025M Phosphatpuffer statt. Da Chlorid schon in minimaler Konzentration aktivierte, mußte man Serum schon seines geringen Anteils am Ansatz (20 von 1000  $\mu$ l) zuvor gegen Phosphatpuffer dialysieren, um die Substitution mit Anionen durchzuführen.

Zur Entfernung von  $Ca^{++}$  wurden Serum und Enzymlösung erschöpfend gegen 0,15M NaCl dialysiert. Mitgeführten Kontrollen wurde anschließend 5 mM  $CaCl_2$  oder  $MgCl_2$  zugesetzt. Bei Tests mit O,O-Diäthyl-O-(4-nitro-phenol)-monothiophosphat (Parathion) wurde der Inhibitor in 0,05 ml Äthanol dem Ansatz zugefügt. Der Kontrollwert erhielt dieselbe Menge Äthylalkohol.

Die Identifizierung der Spaltprodukte erfolgte mittels semiquantitativer Präparation in folgender Weise: Inkubation mehrerer Röhrchen von 0,4 ml 0,8proz. Stärkelösung mit Zusatz von

0,5 ml Tris (0,05M, pH 7,5), 15 mg NaCl und 100  $\mu$ l dialysiertem Serum (gegen 0,2M NaCl zur Entfernung des Blutzuckers) bei 37°. Zu verschiedenen Zeiten wurden 3,75 ml Gemisch entnommen, mit 1,25 ml Äthanol versetzt und bei  $-10^\circ$  gefällt. Je 4,0 ml Überstand (5 Min., 12000 g) wurden im Rotationsverdampfer getrocknet und mit 0,8 ml Wasser gelöst. Aufsetzen von 2 mal 50  $\mu$ l als Duplikat zur Papierchromatographie (Macherey & Nagel 214, n-Butanol-Pyridin-Wasser 6:4:3 v/v viermal 12 Std. aufsteigend mit Maltose als Referenzsubstanz). Nach Anfärbung je einer Probe mit Anilinphtalat wurde das nicht gesprühte Duplikat an entsprechender Stelle ausgeschnitten und mit 20proz. Methanol eluiert. Nach Eindampfen des Eluats zur Trockene ließ sich das Kohlenhydrat mit Anthron (0,05 g Anthron in 100 ml 72proz.  $H_2SO_4$ ) bestimmen ( $t = 15$  Min.,  $T = 100^\circ$ , Vol. 1,5 ml,  $\lambda = 578$  nm,  $d = 1$  cm). 10  $\mu$ g Glucose, Maltose oder (mit Methanol gewaschene) Stärke liefern dabei einheitlich ein  $\Delta E$  von 0,182. Mitführen und Abziehen eines Papiereluats als Leerwert.

### Ergebnisse

#### pH-Abhängigkeit

Das Maximum der Aktivität von Serumamylase lag bei Verwendung von drei verschiedenen Puffern einheitlich bei pH 7,5, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit in Tris größer und in Collidin geringer als in Phosphatpuffer war (Abb. 6). Die vergleichsweise mitgeführte Schweinepankreas-Amylase wies dasselbe Verhalten mit gut definiertem Maximum auf.

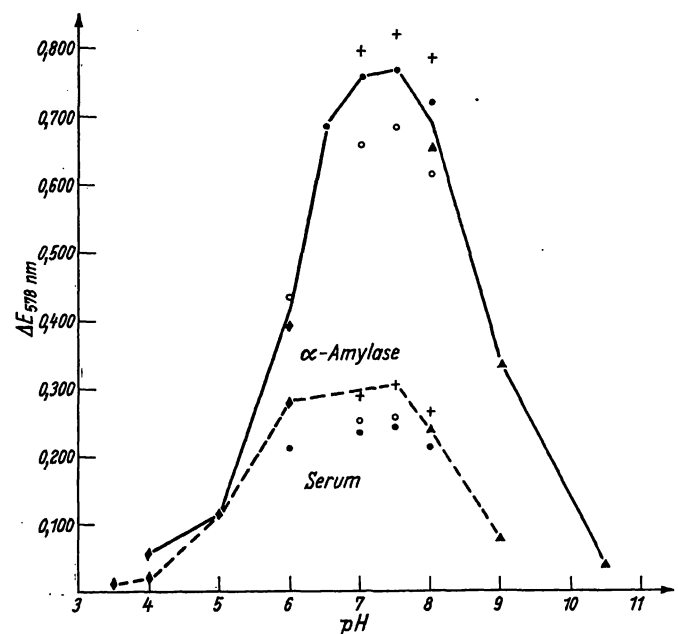


Abb. 6

Aktivität von Serum- und Pankreasamylase in Abhängigkeit vom pH und verschiedenen Puffern (Endkonzentration 0,025M). Vorgehen s. Text

◆ Acetat • Phosphat ○ Collidin + Tris ▲ Barbiturat

### Substratabhängigkeit

In einem maximal mit Chlorid stimuliertem Ansatz wurde bei pH 7,5, 37° und 30 Min. Inkubationszeit der Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt und die mittels Auftragung von  $v$  gegen  $v/S$  (nach HOFSTEE, 23) erhaltenen Michaeliskonstanten in mg Substrat/ml ausgedrückt. Da die geringe Löslichkeit von Amylose keine  $V_{\max}$  zu messen gestattet, wurde die  $K_m$  für dieses Substrat mittels LINEWEAVER-BURK-plot (24) bestimmt.

Die Prüfung der Chloridabhängigkeit ergab mit verschiedenen Seren differente Werte (Tab. 4). Sie liegen jedoch sämtlich über den niedrigeren Angaben der Literatur (4, 9).

Tab. 4  
Kinetische Konstanten von Serum- und Schweinepankreasamylase

		Serum	Schweinepankreas
Stärke	$K_m$	0,60	0,41
mg/ml	$V$	3,5	3,5
Amylose	$K_m$	8,0	5,7
mg/ml	$V$	—	—
Chlorid	$K_m$	4–10	1,9
mM	$V$	72	53

Ersetzte man Chlorid durch andere Anionen, so ergaben sich für dialysiertes Serum folgende relative Reaktionsgeschwindigkeiten (Tab. 5).

Tab. 5  
Relative Aktivität von Serumamylase bei Zusatz von Fluorid, Bromid, Jodid und Nitrat im Vergleich zu Chlorid (50 mM = 1,0). 0,025M Phosphatpuffer, pH 7,5

Konzentration	F'	Br'	J'	NO <sub>3</sub> '
0,5 mM	0,07	0,38	0,18	0,28
5 mM	0,15	0,48	0,20	0,54
50 mM	0,18	0,74	0,30	0,60

Der mit 50 mM Chlorid aktivierte Ansatz konnte durch weiteren Zusatz von 0,1M anderer Halogenionen weder weiter stimuliert (10) noch — entgegen älteren Angaben (9) — gehemmt werden.

### Inhibition

Während Serumamylase von elementarem Jod schon bei 50  $\mu$ M komplett gehemmt wurde, war ihre Aktivität gegenüber Schwermetallionen bis 1 mM resistent. Als Ursache ist die durch die hohe Eiweißkonzentration des Serums eintretende Metallproteinatbildung anzusehen, da gereinigte Enzyme hoher spezifischer Aktivität von  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$  und  $\text{Pb}^{++}$  stark inhibiert werden (25).

Da nach VALLEE und Mitarbeiter (26) die Gegenwart von Calcium das Enzym gegen den Angriff von Proteasen schützt, wird Serumamylase bei Gegenwart komplexbildender Anionen, jedoch nicht durch Dialyse inaktiviert (Tab. 6).

Schwermetall bindende Anionen (Natriumazid, Kaliumcyanid) verursachten bis zu einer Konzentration von

Tab. 6  
Hemmung von  $\alpha$ -Amylase durch Komplexbildner (Standardansatz: Aktivität = 1,0)

Konzentration	Citrat	Serum Borat	EDTA	Schweinepankreas Citrat	Borat	EDTA
0,1 mM	0,93	0,88	0,64	0,91	0,88	0,98
1 mM	0,73	0,71	0,24	0,91	0,88	0,76
10 mM	0,64	0,67	0	0,74	0,90	0,52

5 mM erwartungsgemäß keine Inhibition, während von den thiolalkylierenden Reagenzien *p*-Chlormercuribenzoat stärker als Monojodacetat hemmte. Parathion reduzierte bei 5 mM die Amylase-Aktivität um 10%. Auch der Zusatz von Formalin führte zu partieller Inhibition (Tab. 7).

Tab. 7  
Inhibition von  $\alpha$ -Amylase durch Formaldehyd, Monojodacetat und *p*-Chlormercuribenzoat (pCMB) (Standardansatz: Aktivität = 1,0)

Konzentration	Jodacetat	Serum pCMB	Formaldehyd	Schweinepankreas Jodacetat	pCMB	Formaldehyd
0,1 mM	1,0	1,0	1,0	1,0	0,85	1,0
1 mM	1,0	0,90	0,80	0,80	0,45	0,80
5 mM	0,70	0,60	0,40	0,55	0,15	0,20
10 mM	—	—	0,05	—	—	0

### Aktivierungsenergie

Zwischen 27° und 48° zeigte die Serumamylase eine lineare Temperaturabhängigkeit ihrer Reaktionsgeschwindigkeit, wenn man den  $\log v$  der Geschwindigkeit gegen die absolute reziproke Reaktionstemperatur (in Grad K) aufträgt (Abb. 7). Mittels Arrhenius-Gleichung wurde die Aktivierungsenergie mit 8760 cal/Mol ( $Q_{10} = 1,85$ ) errechnet. Für die Schweinepankreas-Amylase ergab sich ein Wert von 12250 cal/Mol ( $Q_{10} = 1,9$ ).

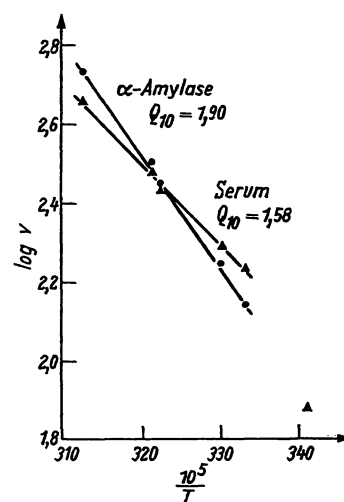


Abb. 7  
Aktivierungsenergie und Temperaturkoeffizient für  $\alpha$ -Amylase (Schweinepankreas) und Serumenzym  
Ordinate:  $\log$  der Geschwindigkeit  $v$  ( $\Delta_E$  578 pro 30 Min.), Abszisse: Reziproke Reaktionstemperatur in Grad Kelvin

### Reaktionsablauf

Obwohl Amylase eine exergonische Reaktion katalysiert, bei der die Energie der gespaltenen  $\alpha$ -Glykosidbindungen verlorengeht, verlief die Reaktion nicht quantitativ bis zum Disaccharid. So produzierten Seren von Gesunden reichlich Dextrine mit  $R_F$ -Werten unter 0,21 (Glucose  $R_F$  0,57, Maltose  $R_F$  0,46, Tri-  $R_F$  0,39, Tetra-  $R_F$  0,33 und Hexa-Saccharid  $R_F$  0,27). Bezog man die Extinktionen der einzelnen Fraktionen auf die nach 2 Stdn. gebildete Glucose ( $\Delta_E$  0,025 = 1,38  $\mu$ g = 1,0), dann ergibt sich ein kontinuierliches Ansteigen von Di-, Tri- und Tetra-Sacchariden mit wachsender Reaktionszeit, während Hexa- und Hepta-Saccharide in

Tab. 8

Abbau von 3 mg (3,75 ml 0,8proz.) löslicher Stärke mit dialysiertem Serum. Papierchromatographische Trennung von 50  $\mu$ l (aus 0,8 ml Lösung) Inkubationsgemisch. Anthronreaktion. Zur Berechnung der relativen Extinktion wurden die Extinktionen ( $\Delta E$  578) der einzelnen Fraktionen auf die nach 2 Stdn. gebildete Glucose ( $\Delta E$  0,025 = 1,38  $\mu$ g = 1,0) bezogen. Einzelheiten s. Methodik

Fraktion		Inkubationsdauer in Stdn.			
		2	4	7	16
Monosaccharid	relative Extinktion	1	1,2	1,4	4,1
	$\Delta E$ 578	0,025	0,030	0,035	0,103
Disaccharid ( $G_2$ )	( $\mu$ g in 0,8 ml)	(22,8)	(26,5)	(31,0)	(88,0)
	relative Extinktion	2,1	3,7	6,4	15,0
Tri- und Tetrasaccharid ( $G_3$ , $G_4$ )	$\Delta E$ 578	0,052	0,092	0,160	0,375
	( $\mu$ g in 0,8 ml)	(46,1)	(81,0)	(140)	(330)
Hexa- und Heptasaccharid ( $G_6$ , $G_7$ )	relative Extinktion	1,2	5,4	8,0	14,2
	$\Delta E$ 578	0,030	0,135	0,200	0,355
„Achroodextrine“	( $\mu$ g in 0,8 ml)	(26,5)	(118)	(175)	(310)
	relative Extinktion	19,5	34,6	39,8	17,0
mg Zucker gesamt in 0,8 ml	$\Delta E$ 578	0,485	0,860	1,000	0,425
	( $\mu$ g in 0,8 ml)	(428)	(750)	(860)	(370)
	relative Extinktion	44,0	43,0	36,0	39,4
	$\Delta E$ 578	1,100	1,080	0,900	0,980
	( $\mu$ g in 0,8 ml)	(970)	(950)	(790)	(870)
		1,94	1,92	1,99	1,97

erheblicher Menge schon nach 2 Stdn. auftreten und ihren Gipfel nach 7 Stdn. erreichen (Tab. 8). Die absoluten Mengen an Kohlenhydrat pro Fraktion errechneten sich aus der Multiplikation des chromatographischen Aliquots (50  $\mu$ l) mit 16, da aus 0,8 ml gelösten Rückstandes entnommen wurde (siehe Methodik). Durch Addition der absoluten Mengen aller Fraktionen ließ sich zeigen, daß von 3 mg Stärke schon nach 4 Stdn. 58% zu Dextrinen und niedermolekularen Zuckern abgebaut wurden und daß deren Gesamtmenge bei weiterer Inkubation nicht mehr anstieg (Tab. 8).

### Diskussion

Die systematische Untersuchung des Verhaltens von Serumamylase ergab, daß die Enzymaktivität in vielen amyloklastischen Verfahren (7, 8, 10, 12, 16, 18, 19) nicht bei Maximalgeschwindigkeit gemessen wird. Dies gilt besonders für die Verwendung von Amylose (17), die wegen schlechter Löslichkeit nicht einmal halbmaximale Geschwindigkeit zuläßt. Hingegen erlaubt die vorstehend beschriebene Methode auch dann noch eine Reaktion nullter Ordnung, wenn ein Extinktionsabfall um 0,600 (578 nm) die Unterschreitung der für V nötigen Substratkonzentration von 3,75 mg Stärke/ml anzeigt. Offenbar reicht der dem Extinktionsabfall entsprechend reduzierte  $\overline{DP}$  des Substrats noch zur Enzymsättigung aus, so daß die Abnahme der Jodstärkefarbe zu diesem Zeitpunkt nur auf eine partielle Degradation der gesamten Stärke zu beziehen ist und nicht dem totalen Umsatz eines Teils derselben entspricht. Da

in Wirklichkeit eine Herabsetzung des  $\overline{DP}$  gemessen wird, ist die Angabe der Amylaseaktivität in mg Stärkeabbau nicht korrekt, die gemessene Extinktionsänderung entspricht lediglich der Reaktion der bezeichneten Stärkemenge mit Jod in der angelegten Eichkurve.

Auch die Zugabe von Chlorid zeigte bei Ermittlung der von Serum zu Serum unterschiedlichen Michaelis-Konstante, daß mit den üblichen Konzentrationen von 12,5 (4) und 25 mM (12) V nicht immer erreicht wurde. Die protektive Wirkung von  $Ca^{++}$  gegenüber Amylase verbietet die Verarbeitung von Oxalat- (27), Citrat- (28) und EDTA-Blut. Die Verwendung von Formaldehyd als Desinfizienz zur Haltbarmachung der Stärkelösung (29) führt zur Hemmung der Enzym-Aktivität, da letztere an die Existenz freier Aminogruppen gebunden ist (30). Die Bedeutung der SH-Gruppen im Enzymmolekül wird durch den hemmenden Einfluß der Thiolreagenzien demonstriert.

Die nach 2 Stdn. Inkubationsdauer auftretende Glucose läßt auf eine Abspaltung vom reduzierenden Ende der Hexa- oder Hepta-Saccharide schließen. Ihre starke Zunahme nach 16stg. Abbau, synchron mit dem Anwachsen von  $G_2$ ,  $G_3$  und  $G_4$  kann nur durch eine wahllose Spaltung (random attack) von Glykosid-Bindungen in den nach 8 Stdn. abnehmenden Hexa- und Hepta-Sacchariden zurückgeführt werden. Dieser Mechanismus entspricht weitgehend dem Verhalten von  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas, die in Versuchen von ABDULLAH und Mitarbeitern (31) aus zyklischen Oktasacchariden mit einem Überschuß von  $\beta$ -Amylase neben  $G_2$  auch  $G_1$  und  $G_3$  bildet.

### III. Ergebnisse einer neuen amyloklastischen $\alpha$ -Amylasebestimmung

Es werden eine amyloklastische Mikromethode zur Amylasebestimmung und die mit ihr erhaltenen Werte mitgeteilt. Das Verfahren erlaubt Substratsättigung des Enzyms, Messung bei Maximalgeschwindigkeit, Linearität zwischen Enzymaktivität und Jod-Stärke-Reaktion, exakte Berechnung des verbrauchten Substrats, Elimination von Störfaktoren (Protein, Lipide), gute Reproduzierbarkeit und einfache Durchführung.

Als Normalwerte im Serum Gesunder sind 2,2—27,5 mg Stärkeabbau pro ml und Stunde (37°) anzusehen.

#### *A new amyloclastic determination of $\alpha$ -amylase*

The method and results of an amyloclastic  $\alpha$ -amylase microdetermination are reported. The method uses maximal velocity of the enzyme by substrate saturation, permits a linear relationship between enzyme activity and the starch-iodine colour with an exact calculation of the hydrolyzed substrate and elimination of protein and lipid interference. It combines good accuracy with simple procedure.

Normal values in sera of healthy persons: 2.2—27.5 mg starch hydrolyzed per ml per hour (37°).

Die folgende Bestimmung der Amylaseaktivität beruht auf den dargestellten Bedingungen für eine Enzymreaktion nullter Ordnung und den zuvor ermittelten Voraussetzungen für eine Messung im Linearitätsbereich der Jod-Stärke-Reaktion.

### Methodik.

#### Reagenzien

**Substratpufferlösung:** Amylum solubile 0,4%; Tris 0,025M, pH 7,5; Chlorid 0,07M (s. II. Abschnitt).

Es empfiehlt sich, die Lösung in einer automatischen Pipette zu halten, die eine Aufbewahrung im Kühlschrank (Retrogradation!) und Pipettieren mit dem Munde (Speichel!) vermeidet.

**Jodreagenz:** Jod 0,00026N; Kaliumjodid 0,0011N, Essigsäure 1N (s. I. Abschnitt).

#### Vorgehen

20  $\mu$ l Serum (Urin) werden in ein Reagenzglas pipettiert, mit 1,0 ml Substratpufferlösung gemischt und 30 Min. bei 37° inkubiert. Der Leerwert erhält in gleicher Reihenfolge die Substratpufferlösung nach der Inkubationszeit, und beide Ansätze werden anschließend mit 19 ml Jodreagenz versetzt. Sorgfältiges Umwenden der Röhrchen (Parafilm oder Gummistopfen) und Ablesung bei 578 nm in der 1 cm Durchlaufküvette (Photometer „Eppendorf“) gegen Luft und Abziehen des Leerwerts von der Extinktion der zugehörigen Analyse ( $= \Delta E$ ).

Der Leerwert sollte eine Extinktion von 1,450 (bei 578 nm) nicht unterschreiten, anderenfalls ist die Substratpufferlösung neu anzusetzen. Bei einem  $\Delta E$  über 0,600 muß die Probe zuvor verdünnt werden.

#### Berechnung

Durch Multiplikation des  $\Delta E$  der Probe mit 2,3 und mit den Faktoren 2 (Zeit) sowie 50 (Volumen) kann die durch 1 ml Serum in 60 Min. abgebaute Stärke berechnet werden:

$$\Delta E \cdot 230 = \text{mg Stärkeabbau pro ml und Std. (37°)}.$$

### Ergebnisse

#### Enzym- und Zeitabhängigkeit

Bei Einsatz steigender Mengen von Serum und verdünnter  $\alpha$ -Amylase (20  $\mu$ l = 0,05 Willstätter-E.) ergab sich bis zu einem  $\Delta E$  von 0,600 noch Linearität zwischen Enzymaktivität und Extinktionsabnahme. Dadurch blieben Serumamylase-Konzentrationen, welche die Normgrenze um den Faktor 5 überschreiten, ohne vorherige Verdünnung noch exakt meßbar (Abb. 8).

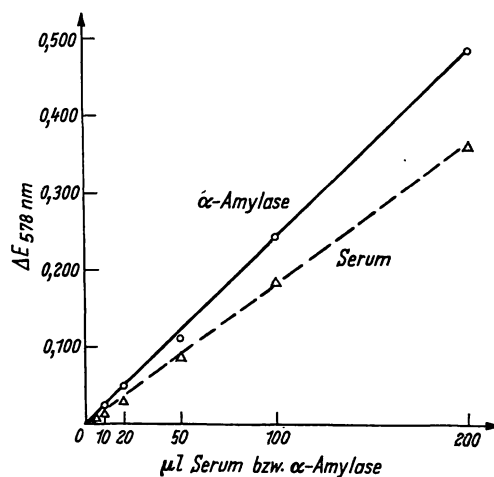


Abb. 8

Umsatz von Stärke durch steigende Volumina Serum und  $\alpha$ -Amylase-lösung (1,25 Willstätter-E/ml)

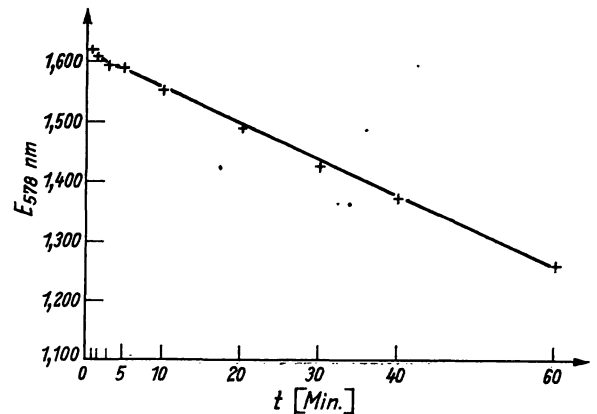


Abb. 9

Extinktionsabfall im Standardansatz durch 20  $\mu$ l Pankreatitisserum, zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen

Auch bezüglich der Zeitabhängigkeit ließen sich bis zu einer Inkubationsdauer von einer Stunde lineare Verhältnisse nachweisen (Abb. 9).

#### Reproduzierbarkeit

Die Mehrfachbestimmung eines Poolserums von Gesunden und Patienten mit einer Pankreatitis zeigte bei  $n = 20$  Analysen und einem Mittelwert  $\bar{x} = 38$  mg ( $\Delta E$  0,165) eine Standardabweichung  $s = 1,5$  mg/ml Std. ( $\Delta E$  0,007). Das entsprach einem Variationskoeffizienten von 3,9%.

#### Klinische Ergebnisse

Mit dem angegebenen Verfahren wurden innerhalb eines halben Jahres 1030 Seren untersucht, von denen 153 einen Stärkeabbau von mehr als 27,5 mg pro ml Serum und Stunde aufwiesen. Dieser Grenzwert wurde durch Untersuchungen an einem Kollektiv von 50 gesunden Blutspendern, die eine lognormale Häufigkeitsverteilung der Werte aufwiesen, ermittelt (Auftragung im Wahrscheinlichkeitsnetz). Bei einem Mittelwert von 9,2 mg Stärkeabbau ml und Std. betrug die normale Variation (1 $\sigma$ -Bereich) 6,2–18,4, die Grenzwerte (90%-Bereich) lagen bei 2,2 und 27,5 mg/ml und Std. Weitere 80 Patienten, bei denen gastrointestinale Leiden und Erkrankungen der Parotis mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnten, wiesen Amylaseaktivitäten innerhalb dieser Grenzen auf. Über das Verhalten der Serumamylase bei einigen Erkrankungen, die durch andere Untersuchungen (Lipasebestimmung, Biopsie, Operation, Autopsie) diagnostiziert wurden, unterrichtet Tabelle 9.

Tab. 9

Serumamylase-Werte von 50 Gesunden und 126 Patienten mit Erkrankungen des Digestionstraktes

Erkrankung	n	mg Stärkeabbau pro ml Serum in 1 Std.	$\bar{x}$
Pankreatitis	26	4,4–257	61,5
Parotitis	15	18,7–163	54,3
Cholecystitis	51	0,9–35,2	13,8
Hepatitis	15	4,4–90	19,0
Lebercirrhose	19	0–31,4	11,4
		90%-Bereich	
Normalkollektiv	50	2,2–27,5	9,2



# Reagenziensätze für Analysen in einem Glas mit Asal-Monopacks

Serum pipettieren

öffnen

messen

GOT-Monopack  
Transaminaseaktivität  
im Serum

GPT-Monopack  
Transaminaseaktivität  
im Serum

Ferro-Monopack  
Eisen im Serum

Chemische Fabrik Asal  
6231 Schwalbach/Taunus  
Telefon (061 96) 30 31



## PRÄZISIONS-CHEMIKALIEN

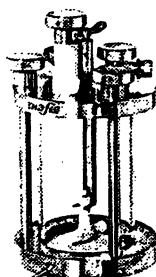
Für schnelle Konzentrierung, Reinigung und Fraktionierung von biologischen Flüssigkeiten

**Diaflo®**

## MEMBRAN ULTRAFILTRATION

DIAFLO Membranen, in AMICON Ultrafiltrationszellen eingesetzt, konzentrieren verdünnte Proteinlösungen innerhalb kurzer Zeit 10 bis 1000-fach. Eine vollständige Beseitigung der Salze oder anderer kleiner Moleküle kann innerhalb der gleichen Zeit mittels Diafiltration erzielt werden.

DIAFLO Membranen verstopfen nicht und sind wieder verwendbar. Jeder Membrantyp besitzt eine bestimmte chemische Beständigkeit und charakteristische physikalische Eigenschaften. Alle Membranen sind nicht denaturierend und biologisch inert.



AMICON  
ULTRAFILTRATIONS-  
ZELLEN erlauben das  
Arbeiten mit biologischen  
Flüssigkeiten von  
1 ML BIS ZU 20 LITERN

Amicon bietet ausserdem grössere industrielle Anlagen für kontinuierliche Verfahren.

**amicon**

Abt.: 05

AMICON N.V.  
In den U.S.A.:

Heemskerckstraat 43  
27 Hartwell Ave.

DEN HAAG  
Lexington

HOLLAND Ruf : (070) 642820  
MASS. 02173

**Diaflo®**  
MEMBRANEN

	Die Membran ist undurchlässig für Moleküle oberhalb der Linie u. durchlässig für solche unterhalb der Linie. Bakterien, Viren, Globulin und andere Makromoleküle und Proteine mit hohem MG	Molekulare Trenngrenze
XM-100		100 000 MG
	Human Albumin Hämoglobin	FRAKTIONIERUNG
XM-50		50 000 MG
	Pepsin	KONZENTRIERUNG
PM-30		30 000 MG
	t RNA Myoglobin Cytochrom C	REINIGUNG
PM-10 UM-10		10 000 MG
	Polypeptide Peptide Insulin 6000 Vit. B 12 Grosse Antibiotika	TRENNUNG
UM-2		1000 MG
	Zucker Kleine Antibiotika	DIALYSE
UM-05		500 MG
	Glukose Harnstoff Elektrolyte Na, Cl, K, usw. Aminosäuren	

Tab. 10  
Vergleich des beschriebenen Verfahrens mit der Methode von SMITH und ROE (7) bei 69 Bestimmungen der Serumamylase

Erkrankung	n	Pankreatitis 9	Parotitis 6	Cholecystitis 36	Hepatitis 8	Lebercirrhose 10
beschriebene Methode	mg Stärkeabbau pro ml und Std. ( $\bar{x}$ )	4,4—143 (46,8)	18,7—163 (50,3)	0,9—35,2 (13,8)	4,4—29,4 (13,9)	0—31,4 (11,4)
SMITH und ROE (7)	mU/ml ( $\bar{x}$ ) (= 0,05 · Somogyi-U.)	698—3150 (2025)	950—2350 (1620)	103—920 (471)	708—1970 (1070)	440—1970 (1020)
SMITH und ROE (7)	umgerechnet auf mg Stärkeabbau ( $\bar{x}$ )	4,4—52,2 (24,6)	19,8—37,4 (29,1)	0,9—33,6 (12,7)	4,4—29,4 (12,2)	2,3—31,4 (14,1)

Die Frage eines signifikanten Unterschiedes der Mittelwerte in den einzelnen Gruppen vom Mittelwert des Normalkollektivs wurde mittels t-Test geprüft. Sie ließ sich für Parotitis ( $t = 7,2$ ;  $t_{0,05} = 2,0$ ) und Pankreatitis ( $t = 7,2$ ;  $t_{0,05} = 1,99$ ), nicht aber für die anderen Erkrankungen bejahen.

Zur Kontrolle unseres Verfahrens wurde die Methode von SMITH und ROE (7), nach RICHTERICH und COLOMBO (12) benutzt. Bei 74 Beobachtungspaares von Normalwerten (im 90%-Bereich) fand sich ein Korrelationskoeffizient von 0,433, ( $r_{0,01} = 0,298$ ). Bei 11 Beobachtungspaares mit erhöhten Werten betrug der Korrelationskoeffizient 0,802 ( $r_{0,01} = 0,765$ ).

Eine Gegenüberstellung jener Untersuchungen, die gleichzeitig mit der Methode von SMITH und ROE (7) geprüft wurden, zeigt Tabelle 10. Die dort nach letzterem Verfahren erhaltenen Normalwerte (Mittel- und Grenzwerte) entsprechen vollkommen den Befunden von GOLL (32) an 514 Gesunden.

## Diskussion

Zum Vergleich dieser Angaben mit den Ergebnissen anderer Autoren sei hier eine Übersicht der üblichen Einheiten und ihrer gegenseitigen Umrechnung gegeben. Wird das Molekulargewicht der Stärke als Vielfaches der Anhydroglukose mit  $(162)_n$  angenommen,

und wird 1 Somogyi-Einheit (1 S.U. ist die Enzymmenge, die in 30 Min. bei 37° und pH 7,5 1 mg „reduzierende Substanz“ bildet) (10) als Abbau von 5 mg Stärke in 15 Min. ausgedrückt, so gilt: 1 S.U./100 ml Serum = 20,6 mU/ml Serum (KING und CAMPBELL, 33). Analog entspricht 1 STREET-CLOSE-Unit der Hydrolyse von 20 mg Amylose in 15 Min. bei 37° und pH 7,0. Somit ergibt sich, da alle Bestimmungen bei 37° durchgeführt werden:

1 mg Stärkeabbau/ml und Std. = 103 mU/ml = 5 S.U./100 ml = 1,6 STREET-CLOSE-U./100 ml. Wegen des unbekannten und uneinheitlichen Molekulargewichtes von Stärke empfehlen wir die Aktivitätsangabe in mg abgebauten Substrats, da selbst bei verschiedenen Chargen fast identische Resultate erhalten werden (4).

Die beschriebene Methode erwies sich im klinischen Routinelabor als brauchbar, da sie im Vergleich zu allen bisherigen Verfahren (Tab. 3) die höchste Substratkonzentration einsetzt, eine Messung bei Maximalgeschwindigkeit gestattet, im Linearitätsbereich der Jod-Stärke-Reaktion arbeitet und deren Störung durch Protein infolge gleich angesetzter Leerwerte eliminiert. Im Gegensatz zum Reaktionsstop mit verdünnter Salzsäure (7) unterbricht 1N Essigsäure die enzymatische Stärkehydrolyse prompt (16) ohne das Substrat durch Säurehydrolyse abzubauen, so daß eine stabile Extinktion resultiert.

## Literatur

1. SZEJTLI, J., M. RICHTER und S. AUGUSTAT, *Biopolymers* 5, 5 (1967).
2. SZEJTLI, J., S. AUGUSTAT und M. RICHTER, *Biopolymers* 5, 17 (1967).
3. BAILY, J. M. und W. J. WHELAN, *J. biol. Chemistry* 236, 969 (1961).
4. HENRY, R. J. und N. CHIAMORI, *Clin. Chem. New York* 6, 434 (1960).
5. CALDWELL, M. L. und M. ADAMS, *Adv. Carbohydrate Chem.* 5, 229 (1950).
6. SEN GUPTA, U. K., A. K. MUKHERJEE und K. K. SEN GUPTA, *Koll. Zschr.* 208, 32 (1966).
7. SMITH, B. W. und J. H. ROE, *J. biol. Chemistry* 179, 53 (1949).
8. REIF, A. E. und D. C. NABSETH, *Clin. Chem. New York* 8, 113 (1962).
9. HUGGINS, C. und P. RUSSEL, *Ann. Surg.* 128, 668 (1948).
10. SOMOGYI, M., *Clin. Chem. New York* 6, 23 (1960).
11. KERN, E., H. W. LO, C. FLUX, H. SCHIMMELPENNIG und U. BILLMANN, *Klin. Wschr.* 35, 572 (1957).
12. RICHTERICH, R. und J. P. COLOMBO, *Ärzt. Lab.* 8, 33 (1962).
13. SEARCY, R. L., I. UJIHARA, S. HAYASHI und J. E. BERK, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 9, 505 (1964).
14. UJIHARA, I., R. L. SEARCY, J. E. BERK und S. HAYASHI, *Clin. Chem. New York* 11, 97 (1965).
15. PIMSTONE, N. R., *Clin. Chem. New York* 10, 891 (1964).
16. FRIED, R. und J. HOEFLMAYR, *Ärzt. Lab.* 11, 42 (1965).
17. STREET, H. N. und J. R. CLOSE, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 1, 256 (1956).
18. ZINKER, E. P. und F. J. REITHEL, *J. Laborat. Clin. Med. S. Louis* 34, 1312 (1949).
19. VAN LOON, E. J., M. R. LIKINS und A. J. SEGER, *Amer. J. Clin. Path.* 22, 1134 (1952).
20. WILDING, P., *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 12, 97 (1965).
21. SEARCY, R. L., S. HAYASHI, E. M. HARDY und J. E. BERK, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 12, 631 (1965).
22. THEODORSEN, L., *Abstr. 10. Meeting Scand. Soc. Clin. Chem.* (1965) p. 62.
23. HOFSTEE, B. H. J., *Nature London* 184, 1296 (1959).
24. LINEWEAVER, H. und D. BURK, *J. Amer. chem. Soc.* 56, 658 (1934).
25. LORENTZ, K., *Untersuchungen über Eigenschaften und Herkunft menschlicher Serumamylase. Habilitationsschrift, Lübeck* (1969).
26. VALLEE, B. L., E. A. STEIN, W. N. SUMERWELL und E. H. FISCHER, *J. biol. Chemistry* 234, 2901 (1959).
27. Mc GEACHIN, R. L., H. K. DAUGHERTY, L. A. HARGAN und B. A. POTTER, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 2, 75 (1957).
28. STREET, H. V., *Biochem. J.* 76, 10 (1960).
29. MARTINEK, R. G., *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 9, 590 (1964).
30. LITTLE, J. E. und M. L. CALDWELL, *J. biol. Chemistry* 142, 585 (1942).
31. ABDULLAH, M., D. FRENCH und J. F. ROBYT, *Arch. Biochem. Biophysics* 114, 595 (1966).
32. GOLL, K. H., *Dtsch. Ges. wesen* 21, 1078 (1966).
33. KING, E. J. und D. M. CAMPBELL, *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 6, 301 (1961).

Dr. K. Lorentz

24 Lübeck, Kronsfordter Allee 71—73